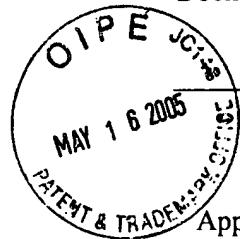


Att 1645
May 13, 2005

Page 1 of 1



Please Direct All Correspondence to Customer Number **20995**

TRANSMITTAL LETTER

Applicant	:	Lee, et al.
App. No	:	10/009,792
Filed	:	December 13, 2001
For	:	ESCHERICHIA COLI STRAIN SECRETING HUMAN GRANULOCYTE COLONY STIMULATING FACTOR (G-CSF)
Examiner	:	S. Devi
Art Unit	:	1645

CERTIFICATE OF MAILING

I hereby certify that this correspondence and all marked attachments are being deposited with the United States Postal Service as first-class mail in an envelope addressed to: Commissioner for Patents, P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450, on

May 13, 2005

(Date)

Suzanne Jepson

Suzanne G. Jepson, Ph.D., Reg. No. 51,848

Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

Dear Sir:

Enclosed for filing in the above-identified application is:

- (X) Certified copy of Korean Application No. 10-2000-0017052 dated March 31, 2000.
- (X) The Commissioner is hereby authorized to charge any additional fees which may be required, or credit any overpayment, to Account No. 11-1410.
- (X) Return prepaid postcard.

Suzanne Jepson
Suzanne G. Jepson, Ph.D.
Registration No. 51,848
Agent of Record
Customer No. 20,995
(619) 235-8550



별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto
is a true copy from the records of the Korean Intellectual
Property Office.

출 원 번 호 : 10-2000-0017052
Application Number

출 원 년 월 일 : 2000년 03월 31일
Date of Application MAR 31, 2000

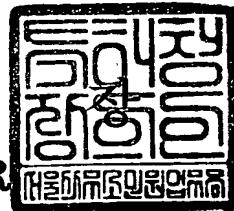
출 원 인 : 한국과학기술원
Applicant(s) Korea Advanced Institute of Science and Technology



2005 년 04 월 27 일

특 허 청

COMMISSIONER



【서지사항】

【서류명】	명세서 등 보정서
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2001.06.28
【제출인】	
【명칭】	한국과학기술원
【출원인코드】	3-1998-098866-1
【사건과의 관계】	출원인
【대리인】	
【성명】	이한영
【대리인코드】	9-1998-000375-1
【포괄위임등록번호】	1999-020229-3
【사건의 표시】	
【출원번호】	10-2000-0017052
【출원일자】	2000.03.31
【심사청구일자】	2000.03.31
【발명의 명칭】	인체 과립성 백혈구의 콜로니 자극인자를 분비하는 대장균
【제출원인】	
【접수번호】	1-1-00-0064819-46
【접수일자】	2000.03.31
【보정할 서류】	명세서등
【보정할 사항】	
【보정대상항목】	별지와 같음
【보정방법】	별지와 같음
【보정내용】	별지와 같음
【취지】	특허법시행규칙 제13조의 규정에 의하여 위와 같이 제출합니다. 대리인
	이한영 (인)

【수수료】

【보정료】 0 원

【추가심사청구료】 0 원

【기타 수수료】 0 원

【합계】 0 원

【보정서】

【보정대상항목】 식별번호 30

【보정방법】 정정

【보정내용】

<30> 본 발명자들이 hG-CSF 융합단백질을 생산하고 주변 세포질로 분비하는 형질 전환된 대장균을 제조하기 위하여 제조한 플라스미드 벡터 pTHKCSFmII는 hG-CSF 단백질을 암호화(coding)하는 cDNA, hG-CSF 단백질의 분비를 위한 엔도자일라나제(endoxylanase) 분비 신호서열, 유도가능한 강력한 프로모터인 Trc 프로모터, 분비 과정이 일어나지 않는 카나마이신 저항 유전자(kanamycin resistance gene) 및 엔도자일라나제 분비신호서열과 hG-CSF 단백질 사이에 위치하는 연속된 6개의 히스티딘 잔기가 있는 13개의 아미노산으로 구성된 올리고펩타이드(oligopeptide)를 암호화하는 염기서열을 포함한다: 이때, hG-CSF 단백질을 암호화(coding)하는 cDNA는 인간의 유방암세포(human breast carcinoma)의 cDNA 라이브러리(library)로부터 얻어진 3번째 액손이 결여(deletion)되어 있는 hG-CSF cDNA와 합성된 3번째 액손의 재조합을 통하여 수득하고, 대장균에서 hG-CSF 단백질의 분비를 위해 고초균(*Bacillus* sp.)에서 유래한 엔도자일라나제 분비 신호서열을 이용하며, 균주의 선별을 위하여 카나마이신 저항 유전자를 이용한다. 더욱이, hG-CSF 단백질이 대장균에서 분비될 때 발생하는 세포의 용해(lysis)를 방지하기 위하여, 엔도자일라나제 분비신호서열과 hG-CSF 단백질 사이에 연속된 6개의 히스티딘 잔기를 포함한 13

개의 아미노산으로 구성된 올리고펩타이드(oligopeptide)를 암호화하는 염기서열을 삽입하였으며 그 아미노산 서열은 N'-Ala-Gly-Pro-His-His-His-His-His-Ile-Glu-Gly-Arg-C'(서열번호 1)이다.

【보정대상항목】 식별번호 57

【보정방법】 정정

【보정내용】

<57> 분비된 hG-CSF 융합단백질에서 엔도자일라나제 분비 신호서열이 올바르게 제거되었는지를 확인하기 위하여, SDS-PAGE로부터 hG-CSF 융합단백질을 분리하고, 이의 N-말단 아미노산 염기서열을 분석한 결과, N'-알라닌-글리신-풀롤린-히스티딘-히스티딘-히스티딘-히스티딘-히스티딘-이소류신-글루탐산-글리신-아르기닌-트레오닌-C'의 염기서열을 확인하였는 바, 이는 hG-CSF 융합단백질의 N-말단 아미노산 서열과 정확하게 일치하는 것이므로, hG-CSF 융합단백질이 대장균에서 성공적으로 분비됨을 알 수 있었다. 두가지 배양온도 중, 37°C에서 배양하였을 때보다 30°C에서 배양하였을 때에, 높은 분비효율 및 높은 hG-CSF 융합단백질의 함량을 나타내었으며, 5가지 재조합 대장균주 중에서 BL21(DE3)와 MC4100이 가장 높은 단백질 생성율을 나타내었다. 이에, 전기 재조합 플라스미드 pTHKCSFmII로 형질전환된 대장균 MC4100을 대장균 MC4100/pTHKCSFmII(*Escherichia coli* MC4100/pTHKCSFmII)라 명명하고, 이를 2000년 3월 13일 국제기탁기관인 한국과학기술연구원 부설 생명

공학연구소 유전자은행(KCTC)에 기탁번호 KCTC 0754BP로 기탁하였다.

【보정대상항목】 청구항 6

【보정방법】 정정

【보정내용】

제 3항의 플라스미드 벡터 pTHKCSFmII로 형질전환된 대장균
MC4100/pTHKCSFmII(KCTC 0754BP).

【보정대상항목】 서열목록

【보정방법】 정정

【보정내용】

<110> Korea Advanced Institute of Science and Technology
<120> Escherichia coli Strain Secreting Human Granulocyte Colony
 Stimulating Factor(G-CSF)
<130> DP00301
<160> 16
<170> KopatentIn 1.71
<210> 1
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> oligopeptide
<400> 1

Ala Gly Pro His His His His His Ile Glu Gly Arg

<210> 2
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> primer
<400> 2
gcgaattcat ggctggacct gccacccag 29
<210> 3
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> primer
<400> 3
gcggatcctt attaggctg ggcaagggtgg cg 32
<210> 4
<211> 50
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> primer
<400> 4
tcctcggtt ggcacagctt gtaggtggca cacagcttct cctggagcgc 50
<210> 5
<211> 50
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> primer
<400> 5
gctgtgccac cccgaggagc tggtgctgct cggacactct ctggcatcc 50
<210> 6
<211> 50
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>

<223> primer
<400> 6
ctggctgggg cagctgctca ggggagccca ggggatgcc agagagtgtc 50
<210> 7
<211> 48
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> primer
<400> 7
agcagctgcc ccagccaggc cctgcagctg gcaggctgct tgagccaa 48
<210> 8
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> primer
<400> 8
gaattcatat gaccccttg ggccctgcc a 32
<210> 9
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> primer
<400> 9
gaattcatat gactccgtta ggtccagcc a 32
<210> 10
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> primer
<400> 10
ggaattcaca tttttttttt taaaaagaaa ttc 33
<210> 11
<211> 29

<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	primer	
<400>	11	
ggctggacct aacggagttg cagaggcgg		29
<210>	12	
<211>	33	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	primer	
<400>	12	
gcaaccgcct ctgcaactcc gtttaggtcca gcc		33
<210>	13	
<211>	33	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	primer	
<400>	13	
gcgaattctt taaagccacg ttgtgtcctc aaa		33
<210>	14	
<211>	36	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	primer	
<400>	14	
gcgaattctt taaattagaa aaactcatcg agcatac		36
<210>	15	
<211>	39	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	primer	
<400>	15	

caccatcacc atatcgaaagg ccgtactccg ttaggtcca

39

<210> 16

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 16

gatatggta tggtgatggt gcggggccagc tgcagaggcg g

41

【서지사항】

【서류명】	특허출원서
【권리구분】	특허
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2000.03.31
【발명의 명칭】	인체 과립성 백혈구의 콜로니 자극인자를 분비하는 대장균
【발명의 영문명칭】	Escherichia coli Strain Secreting Human Granulocyte Colony Stimulating Factor(G-CSF)
【출원인】	
【명칭】	한국과학기술원
【출원인코드】	3-1998-098866-1
【대리인】	
【성명】	이한영
【대리인코드】	9-1998-000375-1
【포괄위임등록번호】	1999-020229-3
【발명자】	
【성명의 국문표기】	이상엽
【성명의 영문표기】	LEE,Sang Yup
【주민등록번호】	640412-1025515
【우편번호】	305-390
【주소】	대전광역시 유성구 전민동 464-1 엑스포 아파트 212-702
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	정기준
【성명의 영문표기】	JEONG,Ki Jun
【주민등록번호】	700927-1481010
【우편번호】	305-335
【주소】	대전광역시 유성구 궁동 392-3 과기원 아파트 102동 411호

【국적】 KR

【심사청구】 청구

【미생물기탁】

【기탁기관명】 생명공학연구소 유전자은행(KCTC)

【수탁번호】 KTCT 0754BP

【수탁일자】 2000.03.13

【핵산염기 및 아미노산 서열목록】

【서열개수】 016

【서열목록의 전자문서】 첨부

【취지】 특허법 제42조의 규정에 의한 출원, 특허법 제60조의 규정
에 의한 출원심사 를 청구합니다. 대리인
이한영 (인)

【수수료】

【기본출원료】 20 면 29,000 원

【가산출원료】 25 면 25,000 원

【우선권주장료】 0 건 0 원

【심사청구료】 9 항 397,000 원

【합계】 451,000 원

【감면사유】 정부출연연구기관

【감면후 수수료】 225,500 원

【첨부서류】 1. 요약서·명세서(도면)_1통 2. 미생물기탁증명서_1통

【요약서】

【요약】

본 발명은, 카나마이신 저항유전자, 엔도자일라나제 분비신호서열, 연속된 6 개의 히스티딘(histidine) 잔기를 포함한 13개의 아미노산으로 구성된 올리고펩타이드(oligopeptide)를 암호화하는 염기서열, 변형된 hG-CSF 유전자 및 Trc 프로모터를 포함하는 재조합 플라스미드 벡터, 전기 플라스미드 벡터로서 형질전환된 대장균 및 전기 대장균에서 분비되는 hG-CSF 융합단백질로부터 순수한 hG-CSF를 제조하는 방법을 제공한다. 본 발명에 의하면, 종래의 기술에 의하여 hG-CSF 단백질이 세포질 내에 응집하도록 생산되는 대장균에서 hG-CSF 단백질을 정제하는데 요구되는 세포질내 불용성 응집체를 가용화 및 재생하는 복잡한 공정이 요구되지 않고, 대량의 hG-CSF 융합단백질을 주변 세포질로 효율적으로 분비하게 하며, 비교적 간단한 공정을 통하여 전기 hG-CSF 융합단백질로부터 순수한 hG-CSF 단백질을 제조할 수 있으므로, 이들을 유효성분으로 하는 항암 보조치료제의 개발에 널리 이용할 수 있을 것이다.

【대표도】

도 14

【색인어】

인체유래 과립구 콜로니 자극인자, hG-CSF, 분비

【명세서】

【발명의 명칭】

인체 과립성 백혈구의 콜로니 자극인자를 분비하는 대장균{Escherichia coli Strain Secreting Human Granulocyte Colony Stimulating Factor(G-CSF)}

【도면의 간단한 설명】

- <1> 도 1은 플라스미드 p19CSF에 삽입된 hG-CSF 유전자의 염기서열이다.
- <2> 도 2은 플라스미드 p19CSFm의 제작과정 및 유전자 지도이다.
- <3> 도 3은 플라스미드 p19CSFm에 삽입된 hG-CSF 유전자의 염기서열 및 암호화하는 아미노산 서열이다.
- <4> 도 4는 플라스미드 pEDCSFm의 제작과정 및 유전자 지도이다.
- <5> 도 5는 플라스미드 pEDCSFm에 삽입된 hG-CSF 유전자의 염기서열 및 아미노산 서열이다.
- <6> 도 6은 플라스미드 pEDCSFmII의 제작과정 및 유전자 지도이다.
- <7> 도 7은 플라스미드 pEDCSFmII에 삽입된 hG-CSF 유전자의 N-말단 염기서열 및 아미노산 서열이다.
- <8> 도 8은 플라스미드 pEDCSFmII로 형질전환된 대장균 BL21(DE3)에서 생산된 hG-CSF 단백질을 SDS-PAGE 상에서 분석한 결과를 나타내는 전기영동 사진이다.
- <9> 도 9는 플라스미드 pTrcSCSFmII의 제작과정 및 유전자 지도이다.

<10> 도 10은 플라스미드 pTrcSCSFmII에 삽입된 hG-CSF 유전자의 N-말단 염기서열 및 아미노산 서열이다.

<11> 도 11은 플라스미드 pTrcKCSFmII의 제작과정 및 유전자 지도이다.

<12> 도 12는 플라스미드 pTHSCSFmII의 제작과정 및 유전자 지도이다.

<13> 도 13은 플라스미드 pTHCSFmII에 삽입된 hG-CSF 유전자의 N-말단 염기서열 및 아미노산 서열이다.

<14> 도 14는 플라스미드 pTHKCSFmII의 제작과정 및 유전자 지도이다.

<15> 도 15는 플라스미드 pTHKCSFmII로 형질전환된 대장균 MC4100에서 생산된 hG-CSF 단백질을 SDS-PAGE 상에서 분석한 결과를 나타내는 전기영동 사진이다.

【발명의 상세한 설명】

【발명의 목적】

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

<16> 본 발명은 인체에서 유래한 과립성 백혈구의 콜로니 자극인자(human Granulocyte-Colony Stimulating Factor, hG-CSF)를 생산하고 분비하는 대장균(*E. coli*)에 관한 것이다. 좀 더 구체적으로, 본 발명은 대장균 내에서 hG-CSF를 분비하도록 설계된 재조합 플라스미드 및 hG-CSF를 분비하도록 전기 플라스미드로서 형질전환된 대장균 및 전기 형질전환된 대장균을 이용한 인체 과립성 백혈구의 콜로니 자극인자의 제조방법에 관한 것이다.

<17> 단구성 대식세포(macrophage), T-세포 및 섬유아세포와 같은 세포에서 생산되는 것으로 알려진 콜로니 자극인자(colony stimulating factor, CSF)는 정상적으로 생체내에서 광범위하게 분포되어 있다. CSF는 크게 과립성 백혈구의 콜로니 자극인자(G-CSF), 단구성 대식세포 콜로니 자극인자(GM-CSF) 및 과립성 백혈구-단구성 대식세포 콜로니 자극인자(GM-CSF)의 3가지로 구분되며, 이중 G-CSF는 조혈성 간세포가 증식 및 분화되어 일어나는 여러가지 혈구 생성에 매우 중요한 역할을 하는 단백질이며, 이의 주요 작용은 과립구 특히 외부 감염으로부터 생체를 보호하는 데 중요한 역할을 하는 호중구(neutrophil)의 수적 증가를 촉진시키는 것이다. 증식성 종양에 대해 최근 널리 이용되고 있는 화학적 치료법은 종양의 성장을 억제하는 동시에 호중구 전구체의 성장 또한 억제하므로, 환자로부터 호중구 보호작용의 감소현상을 일으켜 심한 부작용을 유발하게 된다. G-CSF는 이러한 약물치료 환자들에게 투여되었을 때, 호중구의 수적 증가를 촉진시켜 감염성 질환을 예방하고 치료하는데 효과가 있는 것으로 알려졌다.

<18> 1986년 인체유래 G-CSF 유전자가 나가타(Nagata) 등에 의해 인체의 편평세포암종 세포주 CHU-II로부터 분리되어 그 염기서열이 처음 밝혀졌고, 이의 COS 세포내에서의 발현이 보고되었다(참조: Nagata et al., Nature, 319:415-418(1986)). 인체유래 G-CSF(hG-CSF)는 30개의 분비 서열(signal peptide)을 갖는 174개의 아미노산으로 구성된 당단백질(glycoprotein)이다. 5개의 시스테인(cysteine)이 존재하며, 이 중 4개의 시스테인($\text{Cys}^{36}-\text{Cys}^{42}$, $\text{Cys}^{64}-\text{Cys}^{74}$)이 두 개의 황이중 결합

(disulfide bond)을 형성하여 단백질 접힘(folding) 및 활성(activity)에 중요하게 관여하는 것으로 알려졌다(참조: Hill et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:5167-5171(1993)). hG-CSF는 N-당부가 반응(N-glycosylation)의 공통서열 (consensus sequence, Asn-X-Thr/Ser)은 존재하지 않으며, 133번 트레오닌에서 O-당부가 반응(O-glycosylation) 만이 존재한다. 그러나, 대장균에서 생성된 재조합 G-CSF가 자연상태의 G-CSF와 동일한 활성을 나타내는 것으로 알려져서, 당부가 반응이 G-CSF 활성에 필요하지는 않은 것으로 여겨지고 있다.

<19> 최근의 유전자 재조합 기술의 발달은 박테리아, 식물세포 및 동물세포에서 G-CSF의 생산을 가능하게 하여, 다음과 같은 연구결과들이 보고되어 있다: 수자 (Sauza) 등은 인체 방광암 세포주 5637로부터 cDNA를 분리하여 그의 염기서열을 결정하고, 이것이 대장균(*E. coli*)에서 발현됨을 보고하였다(참조: Souza et al., *Science*, 232:61- (1986)); 일본 쥬가이사에서는 대장균, 식물세포 및 동물세포에서 hG-CSF의 생산에 관한 연구를 통하여 특허를 등록하였다(참조: 대한민국 특허 제 57582호); 일본 교와학꼬사에서는 hG-CSF의 유도체의 제작 및 미생물에서의 생산에 관한 특허를 등록하였다(참조: 대한민국 특허 제 114369호); 동아제약에서도 대장균 세포질내에 hG-CSF 생산에 관한 특허를 등록하였다(참조: 대한민국 특허 제 207951호). 이처럼 지금까지 알려진 대장균에서의 hG-CSF 생산방법은 모두 세포질 내에 생산하는 방법으로 대부분 세포질내 불용성 응집체(inclusion body) 형태로 생산한 다음, 다시 가용화(solubilization) 및 재생(renaturation)하는 과정을 통해 활성을 갖는 hG-CSF를 생산하는 방법을 사용하며, 일부 미량의 수용성(soluble)

hG-CSF를 직접 분리할 수도 있으나, 수많은 대장균 유래 단백질 내에서 hG-CSF 단백질 활성을 갖는 분획을 얻어야 하기 때문에, 이 방법 역시 단백질 수율 면이나 생산비용 면에서 여러 가지 단점을 갖고 있다.

<20> 일반적으로, 대장균에서 주변 세포질로 분비되는 단백질은 분비 신호서열 (secretion signal sequence)을 가지고 있는데, 세포질 밖으로 수송 가능한 모든 단백질은 모두 이 신호서열을 가지고 있으며, 이 신호서열은 주변 세포질에서 시그널 펩티데이즈(signal peptidase)에 의해 잘려지게 된다. 따라서, 이 특정 신호서열은 대장균에서 단백질을 분비하는데 있어 필수적인 것이다. 이에, 대장균에서 분비되지 않는 외래 단백질은 공지된 분비 신호서열(OmpA, OmpF, PelB, PhoA, SpA 등)을 외래 단백질의 N-말단에 연결하거나, 혹은 약간 변형된 신호서열을 연결하여 발현시킴으로써, 주변 세포질이나 배양액으로 분비시키고 있다.

<21> 이처럼 대장균에서 재조합 단백질을 주변세포질로 분비시키는 방법은 상술한 세포질 내에서 생산시키는 방법에 비해 다음과 같은 여러가지 장점을 가지고 있다: 첫째, 주변 세포질에는 세포질 내에 비해 상당히 적은 단백질이 존재하기 때문에 생산된 재조합 단백질의 고 순도 분리 및 정제가 용이하다(참조: Nossal, N.G. et al., *J. Biol. Chem.*, 241:3055-3062(1966)); 둘째, 주변 세포질로 분비된 재조합 단백질은 대부분의 단백질분해효소(protease)가 존재하는 세포질로부터 분리되기 때문에, 세포질 내의 단백질분해효소에 의한 분해를 방지할 수 있어, 재조합 단백질의 생산수율을 증가시킬 수 있다(참조: Meerman and Georgiou, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 721:292-302(1994)); 셋째, 주변 세포질은 세포질 내보다 더욱 산화된 환경

이기 때문에 황이중결합(disulfide bond) 형성이 훨씬 용이하게 이루어지고, 결국 생산된 단백질의 올바른 접힘이 가능하여 불용성 응집체의 형성이 현저히 줄어든다 (참조: Hockney, TIBTECH, 12:456-463(1994)).

<22> 이 같은 장점을 지닌 주변 세포질로의 분비방법을 hG-CSF의 대장균에서 생산에 적용한 연구결과가 다음과 같이 보고되었다: 페레즈 등(Perez-Perez et al.)은 대장균에서 이용되는 분비신호서열 중의 하나인 OmpA를 이용하여 hG-CSF의 분비을 시도하였으나 전혀 분비가 일어나지 않았으며, 이를 해결하기 위하여 대장균에 존재하는 샤페론(chaperone) DnaK와 DnaJ 단백질을 동시에 발현시키는 시스템을 이용해서야 겨우 hG-CSF 단백질의 분비을 미량이나마 가능하게 하였다(참조: Perez-Perez et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 210(2):524-529(1995)); 한국의 정봉현 박사팀은 또 다른 분비신호서열인 PelB를 이용하여 hG-CSF의 분비을 시도하였으나 전혀 분비가 되지 않았으며, 세포질 내에 불용성 응집체 형태로 축적되었다 (참조: Chung et al., *J. Ferment. Bioengin.*, 85(4):443-446(1998)).

<23> 따라서, 세포질내 불용성 응집체를 가용화 및 재생하는 복잡한 공정이 요구되지 않는 비교적 간단한 공정을 통하여, 대량의 hG-CSF를 주변 세포질로 분비하는 기술을 개발하여야 할 필요성이 끊임없이 대두되었다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

<24> 이에, 본 발명자는 대장균에서 대량의 hG-CSF를 주변 세포질로 분비시키는

방법을 개발하고자 예의 노력한 결과, 고초균에서 유래한 엔도자일라나제 분비신호 서열 및 연속된 6개의 히스티딘 잔기를 포함한 13개 아미노산으로 구성된 올리고펩타이드(oligopeptide)를 암호화하는 염기서열이 포함된 재조합 플라스미드로 형질 전환된 대장균이 hG-CSF 단백질과 올리고펩타이드가 융합되어있는 hG-CSF 융합단백질을. 효율적으로 분비하여, 전기 형질전환된 대장균을 이용하여 hG-CSF 단백질을 제조할 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

<25> 결국, 본 발명의 주된 목적은 대장균에서 hG-CSF 융합단백질을 효율적으로 분비하도록 설계된 재조합 플라스미드를 제공하는 것이다.

<26> 본 발명의 다른 목적은 전기 플라스미드를 이용하여 형질전환된 대장균을 제공하는 것이다.

<27> 본 발명의 또 다른 목적은 전기 균주를 이용하여 hG-CSF 단백질을 제조하는 방법을 제공하는 것이다.

【발명의 구성 및 작용】

<28> 본 발명의 대장균에서 hG-CSF 융합 단백질을 효율적으로 분비하도록 설계된 재조합 플라스미드는 카나마이신 저항유전자, 엔도자일라나제 분비신호서열, 연속된 6개의 히스티딘 잔기를 포함한 13개의 아미노산으로 구성된 올리고펩타이드(oligopeptide)를 암호화하는 염기서열, 변형된 hG-CSF 유전자 및 Trc 프로모터를

포함하고, hG-CSF 단백질을 효율적으로 분비하는 대장균은 전기 플라스미드 벡터를 이용하여 대장균을 형질전환시켜서 제조되며, 니켈칼럼(Ni-column)과 단백질 분해 효소를 이용하여 형질전환된 대장균으로부터 수득되는 hG-CSF 융합단백질로부터 순수한 hG-CSF 단백질을 제조한다.

<29> 이하, 본 발명을 보다 구체적으로 설명하고자 한다.

<30> 본 발명자들이 hG-CSF 융합단백질을 생산하고 주변 세포질로 분비하는 형질전환된 대장균을 제조하기 위하여 제조한 플라스미드 벡터 pTHKCSFmII는 hG-CSF 단백질을 암호화(coding)하는 cDNA, hG-CSF 단백질의 분비를 위한 엔도자일라나제(endoxylanase) 분비 신호서열, 유도가능한 강력한 프로모터인 Trc 프로모터, 분비과정이 일어나지 않는 카나마이신 저항 유전자(kanamycin resistance gene) 및 엔도자일라나제 분비신호서열과 hG-CSF 단백질 사이에 위치하는 연속된 6개의 히스티딘 잔기가 있는 13개의 아미노산으로 구성된 올리고펩타이드(oligopeptide)를 암호화하는 염기서열을 포함한다: 이때, hG-CSF 단백질을 암호화(coding)하는 cDNA는 인간의 유방암세포(human breast carcinoma)의 cDNA 라이브러리(library)로부터 얻어진 3번째 액손이 결여(deletion)되어 있는 hG-CSF cDNA와 합성된 3번째 액손의 재조합을 통하여 수득하고, 대장균에서 hG-CSF 단백질의 분비를 위해 고초균(*Bacillus* sp.)에서 유래한 엔도자일라나제 분비 신호서열을 이용하며, 균주의 선

별을 위하여 카나마이신 저항 유전자를 이용한다. 더욱이, hG-CSF 단백질이 대장균에서 분비될 때 발생하는 세포의 용해(lysis)를 방지하기 위하여, 엔도자일라제 분비신호서열과 hG-CSF 단백질 사이에 연속된 6개의 히스티딘 잔기를 포함한 13개의 아미노산으로 구성된 올리고펩타이드(oligopeptide)를 암호화하는 염기서열을 삽입하였으며 그 아미노산 서열은 N'-Ala-Gly-Pro-His-His-His-His-His-His-Ile-Glu-Gly-Arg-C'(서열번호 1)이다.

<31> 다음으로, 대장균에 전기 제조된 플라스미드 벡터 pTHKCSFmII를 도입하고, 형질전환시켜 hG-CSF 용합단백질이 분비되는 재조합 대장균을 제조한다: 이때, 사용된 대장균 균주는 BL21(DE3), HB101, MC4100, W3110 및 XL1-Blue을 사용할 수 있으며, 가장 바람직하게는 MC4100을 사용한다. 전기 제조된 플라스미드 벡터 pTHKCSFmII로 형질전환된 대장균 MC4100을 대장균 MC4100/pTHKCSFmII (*Escherichia coli* MC4100/pTHKCSFmII)라 명명하고, 이를 2000년 3월 13일 국제기탁기관인 한국과학기술연구원 부설 생명공학연구소 유전자은행(KCTC)에 기탁번호 KCTC 0754BP로 기탁하였다.

<32> 끝으로, 니켈칼럼(Ni-column)과 단백질 분해효소를 이용하여 전기 균주로부터 분비되는 hG-CSF 용합단백질로 부터 hG-CSF 단백질을 제조한다: 전기 균주는 hG-CSF 단백질의 N-말단에 연속된 6개의 히스티딘을 포함하는 13개의 아미노산으로 구성된 올리고펩타이드가 연결된 형태의 hG-CSF 용합단백질을 분비한다. 분비된 hG-CSF 용합단백질은 올리고펩타이드에 존재하는 연속된 6개의 히스티딘 잔기에 의해 니켈칼럼(Ni-column)으로 분리될 수 있고, 분리된 hG-CSF 용합단백질에 단백질

분해효소를 처리함으로써, 전기 올리고펩타이드를 절단하여 hG-CSF 단백질을 제조 할 수 있다. 이때, 단백질 분해효소는 hG-CSF 단백질을 분해하지 않아야 하므로, 단백질 분해효소로 절단되는 올리고펩타이드의 C-말단의 아미노산 서열이 hG-CSF 단백질을 분해하지 않는 단백질 분해효소에 의하여 절단될 수 있도록 올리고펩타이드의 아미노산 서열을 구성해야만 한다. 그의 일 실시예로서, 본 발명에서는 아미노산서열을 올리고펩타이드의 C-말단이 이소류신-글루탐산-글리신-아르기닌(Ile-Glu-Gly-Arg)의 아미노산 서열을 갖도록 구성하였는 바(서열번호 1), 전기 아미노산서열은 hG-CSF 단백질을 절단하지 않는 단백질 분해효소인 팩터 Xa(Factor Xa)에 의하여 인식되고 절단된다.

<33> 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시 예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

<34> 실시예 1: 인체유래 과립성 백혈구의 콜로니 자극인자(hG-CSF) cDNA의 준비

<35> hG-CSF 유전자를 얻기 위하여 인간의 유방암 세포 cDNA 라이브러리를 표적 DNA로 하여 PCR을 수행하였다. 유전자는 GenBank)을 이용하여 hG-CSF 유전자의

염기서열을 검색한 다음, 프라이머 1: 5' GCGAATTCTGGCTGGACCTGCCACCCAG 3'(서열번호 2)과 프라이머 2: 5' GCGGATCCTTATTAGGGCTGGCAAGGTGGCG 3'(서열번호 3)를 합성하였다. 합성된 프라이머를 PCR로 증폭한 후, 클로닝하기 쉽게 각기 제한 효소인 *Eco*RI과 *Bam*HI의 절단위치(site)를 삽입하였다. PCR 반응은 고도의 PCR 시스템(High Fidelity PCR System, Boehringer Mannheim Co., 독일)을 이용하여 다음과 같이 수행되었다: 첫 번째 변성(denaturation)은 94°C에서 7분간 한번 하였으며, 두 번째 변성은 94°C에서 1분, 교접(annealing)은 50°C에서 1분, 연장(extension)은 72°C에서 1분씩 수행하는 과정을 30회 반복하였다. 이후 72°C에서 7분간 마지막 연장(extension)을 한번 수행하였다. 이 PCR 방법으로 얻어진 DNA를 아가로즈 젤 전기영동법(agarose gel electroporesis)으로 약 530bp 크기의 DNA 절편을 분리하였으며, 이를 두 가지의 제한효소인 *Eco*RI과 *Bam*HI으로 절단하여 DNA 절편을 수득하였다.

<36>

전기 수득한 DNA 절편을 클로닝하기 위하여, 플라스미드 pUC19(참조: Yanisch-Perron et al., *Gene*, 33:109-119(1985))를 두 가지 제한효소 *Eco*RI과 *Bam*HI으로 절단한 뒤, 이를 전기 DNA 절편과 혼합하여 T4 DNA 리가아제(T4 DNA ligase)로 연결(ligation)시키고, 이를 일렉트로포레이션(electroporation) 방법을 이용하여 대장균 XL1-Blue(*supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi relA1 lacF'*(*proAB+ lacIq lacZΔM15Tn(tet^r)*))(참조: Bullock, W. O. et al., *BioTechniques*, 5:376-378(1987))에 도입함으로써, 형질전환된 균주를 수득하였다.

형질전환된 균주는 항생제 엠피실린(ampicillin, 50 μ g/ℓ)이 첨가된 LB 평판배지에서 선별되었고, 이로부터 재조합 플라스미드 p19CSF를 수득하였다. 재조합 플라스미드 p19CSF에 클로닝된 유전자의 염기서열을 자동염기서열 분석기(automatic DNA sequencer, ABI Prism model 377, Perkin Elmer Co., U.S.A.)로 확인하여 본 결과, 공지된 hG-CSF 유전자와 비교하였을 때 중간에 108bp가 결여(deletion)되었음을 확인하였으며, 이를 제외한 나머지 부분(508bp)은 공지된 염기서열과 일치하였다(참조: 도 1). 중간에 결여된 108bp를 hG-CSF의 제노믹 DNA와 비교하여 보았을 때, 총 5개의 액손으로 구성된 hG-CSF 유전자에서 정확히 세 번째 액손에 해당하는 부분이 결여되었음을 알 수 있었다.

<37> 온전한 형태의 hG-CSF 유전자를 확보하기 위하여, 세 번째 액손에 해당하는 프라이머 3: 5' TCCTCGGGTGGCACAGCTTGTAGGTGGCACACAGCTTCTCCTGGAGCGC 3'(서열번호 4), 프라이머 4: 5' GCTGTGCCACCCCGAGGAGCTGGTGCTGCTCGGACACTCTGGGCATCC 3'(서열번호 5), 프라이머 5: 5' CTGGCTGGGCAGCTGCTCAGGGAGCCCAGGGGATGCCAGAGAGTGTC 3'(서열번호 6), 및 프라이머 6: 5' AGCAGCTGCCAGCCAGGCCCTGCAGCTGGCAGGCTGCTTGAG CCAA 3'(서열번호 7)의 4개의 프라이머를 제작하고, 이를 이용하여 PCR 반응을 수행하며, 여기서 얻어진 PCR 산물을 프라이머 1과 함께 p19CSF를 표적 DNA로 하여 PCR 반응을 수행하였으며, 이와 동시에 동일한 방법으로 프라이머 2와의 PCR 반응을 수행하였다. 각각의 PCR 산물을 이용하여 다시 한번 PCR 반응을 수행하였으며, 그 결과의 PCR 산물을 두 개의 제한효소 EcoRI과 BamHI으로 절단하여 pUC19의 동일한 위치에 클로닝하였다. 형질전환 대장균(XL1-Blue)은 항생제 엠피실린(50 μ g/

ℓ)이 첨가된 LB 평판배지에서 선별되었고, 이로부터 재조합 플라스미드 p19CSFm를 수득하였다(참조: 도 2). 플라스미드 p19CSFm에 삽입된 유전자 염기서열을 확인한 결과, 공지된 hG-CSF의 유전자 염기서열과 동일한 유전자를 획득하였음을 알 수 있었다(참조: 도 3).

<38>

실시예 2: 재조합 플라스미드 pEDCSFm의 제조

<39>

실시예 1에서 준비한 hG-CSF 유전자로부터 hG-CSF 단백질을 발현하기 위하여, p19CSFm의 유전자로부터 분비형 염기서열을 제거한 성숙한(mature) hG-CSF 유전자를 클로닝하였다(참조: 도 5). 성숙한 hG-CSF 유전자를 클로닝하기 위하여, 프라이머 7: 5' GCGAATTCTATGACCCCCCTGGGCCCTGCCAGC 3'(서열번호 8)을 제작하였다. 프라이머 7과 프라이머 2를 이용하여 p19CSFm을 표적 DNA로 한 PCR 반응을 수행하였으며, 이를 두 개의 제한 효소 *Nde*I과 *Bam*HI으로 절단하였다. 이와 동시에, T7 프로모터(promoter)를 갖고 있는 플라스미드 pET21c(Novagen Co., U.S.A.)를 두 가지의 제한효소 *Nde*I과 *Bam*HI으로 절단한 뒤, 전기 DNA 절편을 클로닝하였다. 이를 일렉트로포레이션방법으로 대장균 XL1-Blue를 형질전환시켰으며, 형질전환된 균주는 엠피실린(50 μ g/ ℓ)이 첨가된 LB 평판배지에서 선별되었고, 이로부터 재조합 플라스미드 pEDCSFm을 수득하였다(참조: 도 4).

<40>

대장균에서 hG-CSF 생산을 위하여, 대장균(*E. coli*) BL21(DE3)(*F-* *ompT*

hsdSB(rB- mB-) gal dcm (DE3) a prophage carrying the T7 RNA polymerase gene) 을 재조합 플라스미드 pEDCSFm으로 형질전환시켰다. 형질전환된 재조합 대장균을 LB 액체 배지 50ml가 담긴 250ml 플라스크에 접종하여 37°C에서 배양하고, 분광광도계로 600nm 파장에서 측정한 광학밀도(O.D.)가 0.7일 때 1mM의 IPTG(isopropyl- β -thiogalactoside)를 첨가하여, 유전자 발현을 유도(induction)시킨 후, 4시간 후에 배양액 1ml씩을 분주하였다. 분주된 배양액을 4°C에서 6000rpm으로 5분 동안 원심분리하여 세포만을 수득한 후, 이를 0.5ml TE 완충용액(Tris-HCl 10mM; EDTA 1mM, pH 8.0)으로 한번 세척한 다음, 다시 4°C에서 6000rpm으로 5분 동안 원심분리하여 침전시키고, 이를 TE 완충용액 0.2ml 용액에 혼탁하였다. 혼탁액 64μl을 SDS-PAGE 시료용 완충용액(sample buffer, Tris-HCl 60mM: 25% glycerol (v/v): 2% SDS(v/v): 2-mercaptoethanol 14.4mM: 0.1% bromophenol blue) 16μl와 섞고 100 °C에서 10분간 가열한 후, 12%(w/v) 분리용 젤(separating gel)에서 SDS-PAGE(sodium-dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) 젤 전기영동을 수행하였다. 전기 영동이 끝난 젤을 염색용액(coomassie brilliant blue R 0.25g/l : 메탄올 40%(v/v), 아세트산 7%(v/v))에 2시간 동안 담가두어 염색한 후, 탈색용액(메탄올 40%(v/v): 아세트산 7%(v/v))에 2시간 동안 2회 담가두어 탈색시켰다. SDS-PAGE 분석결과, hG-CSF에 해당하는 단백질을 확인할 수 없었다.

<42> 데블린(Devlin) 등은 hG-CSF 유전자의 N-말단에 존재하는 높은 G+C 함량이 대장균에서 hG-CSF 유전자의 전사(transcription) 및 번역(translation)과정을 저해하는 효과가 있다고 보고하였으므로(참조: Devlin et al., *Gene*, 65:13-22 (1988)), hG-CSF 유전자의 N-말단 유전자 염기서열에서 G+C 함량을 낮추고 대장균에서 번역이 용이한 유전자 염기서열로 전환하기 위하여 프라이머 8: 5' GCGAATTATGACTCCGTTAGGTCCAGCCAGC 3'(서열번호 9)을 제작하였다.

<43> 플라스미드 p19CSFm을 표적 DNA로 하고 프라이머 8과 프라이머 2를 이용하여 PCR 반응을 수행하였으며, PCR 산물을 *Nde*I과 *Bam*HI으로 절단하여 다시 플라스미드 pET21c의 같은 위치에 클로닝하였으며, 이를 대장균 XL1-Blue에 형질전환하였다. 형질전환 균주는 엠피실린($50\mu\text{g}/\ell$)이 첨가된 LB 평판배지에서 선별되었고, 여기로부터 재조합 플라스미드 pEDCSFmII를 수득하였다(참조: 도 6). 플라스미드 pEDCSFmII는 실시예 2의 pEDCSFm과 비교하여 N-말단쪽에 아미노산 서열에는 차이가 없지만, 6개의 염기서열에서 차이를 보이고 있다(참조: 도 7), 총 5개의 코돈(dodon)에 변화를 주었다(ACC CCC CTG GGC CCT → ACT CCG TTA GGT CCA).

<44> 플라스미드 pEDCSFmII를 대장균 BL21(DE3)에 형질전환하여 단백질 발현정도를 확인하였다. 재조합 대장균 배양, 전체단백질 획득 및 분석방법은 실시예 2와 동일한 방법으로 수행하였으며, 불용성 응집체의 분획은 다음과 같은 방법으로 수행하였다. 세포 배양액 1ml을 원심분리하여 수득한 균체를 0.5ml의 TE 완충용액(Tris-HCl 10mM; EDTA 1mM, pH 8.0)에 혼탁한 후, 다시 4°C에서 3000 x g로 5분 동안 원심분리하고, TE 완충용액 0.2ml 용액에 혼탁하였다. 초음파분쇄기 (Ultra-

sonicator, Branson Ultrasonics Co., U.S.A.)를 이용하여 균체를 파쇄하고, 4°C에서 10,000 x g로 10분 동안 원심분리하여, 상층액(supernatant)을 수용성 단백질(soluble protein)로 분류한 후, 침전물(pellet)은 TE 완충용액 0.2ml 용액에 혼탁하여 불용성 단백질(insoluble protein)로 분류하였다. 플라스미드 pEDCSFmII로 형질전환된 대장균 BL21(DE3)에서 hG-CSF 단백질 생성정도를 확인한 결과, 전체단백질에 대하여 약 40%에 해당하는 매우 높은 수준의 hG-CSF 단백질이 발현되었음을 알 수 있었고, 생성된 대부분의 hG-CSF는 생물학적 활성을 갖지 않는 불용성 응집체를 형성하고 있음을 SDS-PAGE 상에서 분석하였다. 도 8에서, 레인 M은 단백질 표준 분자량(94, 67, 43, 30, 20 및 14.4kDa)을 나타내며; 레인 1은 유도 발현 후 4시간이 경과한 다음 pEDCSFmII로 형질전환된 대장균 BL21(DE3)의 총 단백질을 나타내며; 레인 2는 수용성 단백질 분획; 및, 레인 3은 불용성 응집체 분획을 나타낸다. 또한, 화살표(←)는 19kDa 크기를 가진 hG-CSF 단백질을 나타낸다. 본 결과를 통하여, hG-CSF의 N-말단에서 유전자 변화가 유전자 발현에 매우 큰 영향을 주었음을 확인할 수 있었으므로, 전기 변화된 유전자를 이후의 hG-CSF 단백질의 분비 실험에서 계속 이용하였다.

<45>

실시예 4: 재조합 플라스미드 pTrcSCSFmII의 제조

<46>

대장균에서 hG-CSF의 분비를 위한 분비신호서열(secretion signal sequenc

e)로서 고초균(*Bacillus* sp.)에서 유래한 엔도자일라나제(endoxylanase) 분비신호서열을 이용하였다. 엔도자일라나제 분비신호서열을 hG-CSF의 N-말단에 융합시키기 위하여 PCR 방법을 이용하였으며, 이를 위하여 프라이머 9: 5' GGAATTCACATGTTAAG TTTAAAAAGAAATTCT 3'(서열번호 10), 프라이머 10: 5' GGCTGGACCTAACGGAGTTGCAGAGG CGG 3'(서열번호 11) 및 프라이머 11: 5' GCAACCGCCTCTGCAACTCCGTAGGTCCAGCC 3'(서열번호 12)을 제작하였다. 엔도자일라나제 유전자가 클로닝 되어있는 pKJX4(참조: Jeong et al., *Enzyme Microb Technol.* 22(7):599-605(1998))를 표적 DNA로 이용하여 프라이머 9 및 10과 함께 PCR 반응을 수행하였으며, 그 결과 엔도자일라나제 분비신호서열을 갖는 PCR 산물을 얻을 수 있었고, pEDCSFmII를 표적 DNA로 이용하여 프라이머 2 및 프라이머 11과 함께 PCR 반응을 수행하였으며, 그 결과 hG-CSF 유전자를 갖는 PCR 산물을 얻을 수 있었다. 전기 2개의 PCR 산물, 프라이머 2 및 프라이머 9를 이용하여 PCR 반응을 수행한 결과, 엔도자일라나제 분비신호서열이 융합된 hG-CSF 유전자를 얻을 수 있었으며, 이 PCR 산물을 두 개의 제한효소 *Af*III와 *Bam*HI으로 절단하였다. 이와 동시에 강력한 유도가능 프로모터인 trc 프로모터를 갖고 있는 플라스미드 pTrc99A(Pharmacia Biotech Co., U.S.A.)를 두 개의 제한효소 *Nco*I과 *Bam*HI으로 절단하고, 이 플라스미드와 전기 PCR 산물을 혼합하여 연결한 후, 이를 대장균 XL1-Blue에 도입하여 대장균을 형질전환시켰다. 형질전환된 균주는 엠피실린(50 μ g/ ℓ)이 첨가된 LB 평판배지에서 선별되었고 이로부터 재조합 플라스미드 pTrcSCSFmII를 수득한 다음(참조: 도 9), 재조합 플라스미드 pTrcSCSFmII에 클로닝

된 hG-CSF 유전자의 N-말단 염기서열을 자동염기서열 분석기(automatic DNA sequencer, ABI Prism model 377, Perkin Elmer Co., U.S.A.)로 확인하였다(참조: 도 10).

<47> 재조합 플라스미드 pTrcSCSFmII로부터 hG-CSF 단백질의 분비를 조사하기 위하여, 플라스미드 pTrcSCSFmII를 대장균 BL21(DE3), 대장균 HB101(*F-* *hsdS20* (*rk-*, *mk-*) *recA13* *ara-14* *proA2* *lacY1* *galK2* *rpsL20(str^r)* *xyI1-5* *mtl-1* *supE44* λ -), 대장균 MC4100(*F-* *araD139* Δ (*argF-lac*)*U169* *rpsL150(str^r)* *relA1* *f1bB5301* *deoC1* *ptsF25* *rbsR*) 및 대장균 W3110(derived from *E. coli* K-12, λ -, *F*-, prototrophic)에 도입하여 대장균들을 형질전환시켰다. 각각의 형질전환된 대장균을 엠피실린이 첨가된 LB 배지(50m ℓ)에 접종하고, 실시예 2에서와 동일한 방법으로 유도발현 및 단백질 분석실험을 수행하였으나, 1mM IPTG를 이용한 유도발현 후 세포의 용해가 매우 급격히 발생하여, 약 2시간이 경과하면 거의 모든 세포가 용해됨을 알 수 있었다. 배양액을 원심분리하여 재조합 대장균을 수득한 다음, 단백질을 SDS-PAGE로 분석하여 보았을 때, hG-CSF에 해당하는 단백질은 확인할 수 없었다.

<48> 실시예 5: 재조합 플라스미드 pTrcKCSFmII의 제조

<49> 재조합 플라스미드 pTrcSCSFmII에 포함된 항생제 엠피실린 저항 유전자(Ap

^r)는 대장균에서 주변세포질로 분비되는 단백질인 베타-락타마제(β -lactamase)를 암호화한다는 것을 고려한다면, 하나의 대장균 내에서 hG-CSF 단백질과 베타-락타마제 단백질의 분비작용이 동시에 발생하여 분비과정에서 경쟁을 일으킬 수 있고, 이 경쟁이 세포의 용해를 유발하여 실시예 4의 결과를 얻었다는 가정 할 수 있다.

전기 가정에 근거하여, 엠피실린 저항 유전자(Ap^r) 대신 선택마커(selection marker)로서 이용 가능하면서 분비되지 않는 카나마이신 저항 유전자(kanamycin resistance gene)를 사용하였다. 항생제 엠피실린 저항 유전자(Ap^r)를 카나마이신 저항 유전자(Km^r)로 치환하기 위하여, 플라스미드 pACYC177를 표적 DNA로 이용하고 프라이머 12: 5' GCGAATTCTTAAAGCCACGTTGTGCCTCAAA 3'(서열번호 13) 및 프라이머 13: 5' GCGAATTCTTAAATTAGAAAAACTCATCGAGCATC 3'(서열번호 14)를 이용하여 PCR 반응을 수행하였다. 그 결과, 카나마이신 저항 유전자를 포함한 PCR 산물을 얻을 수 있었으며, 이를 제한효소 *Dra*I 으로 절단하였다. 플라스미드 pTrcSCSFmII를 제한효소 *Dra*I으로 부분 절단하여 엠피실린 저항 유전자를 제거한 것과 앞의 카나마이신 저항 유전자를 가진 PCR 산물을 혼합하여 연결한 후, 이를 대장균 XL1-Blue에 도입하여 형질전환하였다. 형질전환된 균주를 항생제 카나마이신(25 μ g/ℓ)이 첨가된 LB 평판배지에서 선별하고, 이로부터 재조합 플라스미드 pTrcKCSFmII를 수득하였다(참조: 도 11).

위하여, 플라스미드 pTrcKCSFmII를 4개의 대장균, 대장균 BL21(DE3), 대장균 HB101, 대장균 MC4100, 대장균 W3110에 도입하고 형질전환하였다. 형질전환된 각각의 재조합 대장균을 카나마이신이 첨가된 LB 배지(50mL)에 접종하여, 실시예 2에서와 같은 방법으로 유도발현 및 단백질 분석실험을 수행하였으나, 플라스미드 pTrcSCSFmII를 사용한 실시예 4에서와 동일한 결과를 얻었다. 즉, 플라스미드 pTrcKCSFmII를 사용하였을 때에도 1mM IPTG를 이용한 유도발현후 세포의 용해가 매우 심하게 발생하였으며, 배양액을 원심분리하여 재조합 대장균을 회수하여 단백질을 SDS-PAGE로 분석하여 보았을 때, hG-CSF에 해당하는 단백질은 확인할 수 없었다. 이상의 결과로, 엠피실린 저항 유전자를 카나마이신 저항 유전자로 치환한 효과는 전혀 없었음을 알 수 있었으며, hG-CSF 단백질의 분비작용이 세포의 용해를 유발하기 때문에 이를 해결하기 위한 유전자 조작이 필요함을 알 수 있었다.

<51> 실시예 6: 재조합 플라스미드 pTHSCSFmII 및 pTHKCSFmII의 제작

<52> 세포의 용해를 유발하지 않는 hG-CSF 단백질의 분비를 가능하게 하기 위하여, 엔도자일라나제 분비 신호서열과 hG-CSF 단백질 사이에 작은 올리고펩타이드를 삽입하는 방법을 이용하였다. 이를 위하여, 플라스미드 pEDSCSFmII를 표적 DNA로 하고, 프라이머 14: 5' CACCATCACCATATCGAAGGCCGTACTCCGTTAGGTCCA 3'(서열번호 15) 및 프라이머 15: 5' GATATGGTGATGGTGATGGTGCAGCTGCAGAGGCCGG 3'(서열번호 16)

호 16)를 이용하여 PCR 방법을 수행하였다. 우선, 프라이머 14와 프라이머 2를 이용하여 PCR 반응을 수행하였으며, 이와 동시에 프라이머 15와 프라이머 9를 이용하여 PCR 반응을 수행하였다. 두 PCR 산물을 혼합한 다음, 이에 프라이머 2와 프라이머 9를 더하여 다시 한번 PCR 반응을 수행하고, 그 PCR 산물을 두 개의 제한효소 *Af*I/III와 *Bam*HI으로 절단하였으며, 이를 제한효소 *Nco*I과 *Bam*HI으로 절단된 플라스미드 pTrc99A와 연결한 후, 대장균 XL1-Blue에 도입하여 형질전환하였다. 형질전환된 균주는 엠피실린($50\mu\text{g}/\ell$)이 첨가된 LB 평판배지에서 선별되었고 이로부터 재조합 플라스미드 pTHSCSFmII를 수득하였다(참조: 도 12). 한편, 도 13은 플라스미드 pTHSCSFmII에 삽입된 유전자 염기서열 및 아미노산 서열을 나타내고, 이탈릭체로 나타낸 부분이 엔도자일라나제 분비 신호서열 부분이며, 굵은 글씨로 나타낸 부분이 삽입된 올리고펩타이드 부분이다.

<53>

실시예 5에서와 동일한 방법으로, 엠피실린 저항 유전자(Ap^r)를 카나마이신 저항 유전자(Km^r)로 치환시키기 위하여, 플라스미드 pTHSCSFmII를 제한효소 *Dra*I으로 부분 절단하여 엠피실린 저항 유전자를 제거한 다음, 플라스미드 pTrcKCSFmII를 제한효소 *Dra*I으로 절단하여 얻은 카나마이신 저항 유전자와 연결한 후, 이를 대장균 XL1-Blue에 도입하여 형질전환하였다. 형질전환된 균주는 카나마이신($50\mu\text{g}/\ell$)이 첨가된 LB 평판배지에서 선별되었고, 이로부터 재조합 플라스미드 pTHKCSFmII를 수득하였다(참조: 도 14).

<54> 실시예 7 : 재조합 플라스미드 pTHKCSFmII를 함유한 재조합 대장균에서 hG-CSF 융합단백질의 분비

<55> 플라스미드 pTHKCSFmII을 이용한 hG-CSF 융합단백질의 분비발현여부를 조사하기 위하여, 플라스미드 pTHKCSFmII를 대장균 BL21(DE3), HB101, MC4100, W3110 및 XL1-Blue에 도입하여 형질전환하고, 각각의 재조합 균주를 두가지 온도(37 및 30°C) 조건 하에 LB배지 50mℓ에서 배양한 후, 실시예 2에서와 동일한 방법으로 hG-CSF 융합단백질의 분비발현여부를 조사하였다. 1mM IPTG로 유도발현하고 4시간 후 배양액을 1mℓ씩 분주하고, 이로부터 균체를 수득하며, 전체단백질을 SDS-PAGE로 분석한 결과, 모든 재조합 대장균으로부터 hG-CSF 융합단백질이 분비됨을 확인할 수 있었다(참조: 도 15). 도 15에서, 레인 M은 단백질 표준 분자량(94, 67, 43, 30, 20 및 14.4kDa); 레인 1은 형질전환되지 않은 대장균 MC4100의 총 단백질; 및, 레인 2 와 3는 유도 발현 후 4시간이 경과한 다음에 플라스미드 pTHKCSFmII로 형질전환된 대장균 MC4100의 전체단백질을 각각 나타내며, 화살표(←)는 20 kDa 크기를 가진 hG-CSF 단백질을 나타낸다. 각 대장균에서 분비된 hG-CSF 융합단백질의 양과 분비효율을 표 1에서 나타내었다.

【五 1】

재조합 대장균에서 hG-CSF의 생산량 및 분비효율 비교

숙주세포	전체 단백질 중 hG-CSF의 함량 (%)	hG-CSF의 분비 효율 (%)
------	-------------------------	-------------------

배양온도	30°C	37°C	30°C	37°C
대장균 BL21(DE3)	22.7	22.1	>98	>98
대장균 HB101	13.5	12.8	81	75
대장균 MC4100	22.1	20.8	>98	>98
대장균 W3110	10.5	10.0	77	66
대장균 XL1-Blue	9.4	8.8	56	51

<57> 분비된 hG-CSF 융합단백질에서 엔도자일라나제 분비 신호서열이 올바르게 제거되었는지를 확인하기 위하여, SDS-PAGE로부터 hG-CSF 융합단백질을 분리하고, 이의 N-말단 아미노산 염기서열을 분석한 결과, N'-알라닌-글리신-풀롤린-히스티딘-히스티딘-히스티딘-히스티딘-히스티딘-히스티딘-이소류신-글루탐산-글리신-아르기닌-트레오닌-C'의 염기서열을 확인하였는 바, 이는 hG-CSF 융합단백질의 N-말단 아미노산 서열과 정확하게 일치하는 것이므로, hG-CSF 융합단백질이 대장균에서 성공적으로 분비됨을 알 수 있었다. 두가지 배양온도 중, 37°C에서 배양하였을 때보다 30°C에서 배양하였을 때에, 높은 분비효율 및 높은 hG-CSF 융합단백질의 함량을 나타내었으며, 5가지 재조합 대장균주 중에서 BL21(DE3)와 MC4100이 가장 높은 단백질 생성율을 나타내었다. 이에, 전기 재조합 플라스미드 pTHKCSFmII로 형질전환된 대장균 MC4100을 대장균 MC4100/pTHKCSFmII(*Escherichia coli* MC4100/pTHKCSFmII)라 명명하고, 이를 2000년 3월 13일 국제기탁기관인 한국과학기술연구원 부설 생명공학연구소 유전자은행(KCTC)에 기탁번호 KCTC 0754BP로 기탁하였다.

<58> 전기 형질전환된 대장균 MC4100/pTHKCSFmII(KCTC 0754BP)에서 합성된 hG-CSF

융합단백질이 세포내막(inner membrane)을 통과하여 주변세포질(periplasm)로 분비되는 과정에서 엔도자일라나제 분비 신호서열은 제거되고, 올리고펩타이드와 hG-CSF의 융합단백질이 분비발현되었다. 이 hG-CSF 융합 단백질은 N-말단의 6개 히스티딘 아미노산 서열로 인하여, 니켈칼럼을 사용하여 용이하게 수득할 수 있으며, 분리된 단백질에 팩터 Xa(Factor Xa)를 처리하면 상기 아미노산 서열의 C-말단 부분에서 절단되므로 완전한 hG-CSF 단백질을 제조할 수 있다.

【발명의 효과】

<60> 이상에서 상세히 설명하고 입증하였듯이, 본 발명은 인체에서 유래한 과립성 백혈구의 콜로니 자극인자(hG-CSF) 융합단백질을 분비하는 대장균 및 이를 위한 플라스미드 벡터와 전기 균주로부터 분비되는 전기 단백질로부터 순수한 hG-CSF 단백질을 제조하는 방법을 제공한다. 본 발명에 의하면, 종래의 기술에 의하여 hG-CSF 단백질이 세포질 내에 응집하도록 생산되는 대장균에서 hG-CSF 단백질을 정제하는

데 요구되는 세포질내 불용성 응집체를 가용화 및 재생하는 복잡한 공정이 요구되지 않고, 대량의 hG-CSF 융합단백질을 주변 세포질로 효율적으로 분비하게 하며, 비교적 간단한 공정을 통하여 전기 hG-CSF 융합단백질로부터 순수한 hG-CSF 단백질을 제조할 수 있으므로, 이들을 유효성분으로 하는 항암 보조치료제의 개발에 널리 이용할 수 있을 것이다.

【청구의 범위】

【청구항 1】

카나마이신 저항유전자, 엔도자일라나제 분비신호서열, 연속된 6개의 히스티딘 잔기가 포함된 13개 아미노산으로 구성된 올리고펩타이드를 암호화하는 염기서열, 인체에서 유래한 과립성 백혈구의 콜로니 자극인자(hG-CSF)의 유전자 및 프로모터를 포함하는 플라스미드 벡터.

【청구항 2】

제 1항에 있어서,

올리고펩타이드의 C-말단은 이소류신-글루탐산-글리신-아르기닌(Ile-Glu-Gly-Arg)의 아미노산 서열을 갖는 것을 특징으로 하는
플라스미드 벡터.

【청구항 3】

카나마이신 저항유전자, 고초균(*Bacillus* sp.)에서 유래된 엔도자일라나제 분비신호서열, 서열번호 1의 올리고펩타이드를 암호화하는 염기서열, N-말단을 암호화 하는 유전자의 서열로서 서열번호 26의 유전자 서열을 포함하는 변형된 인체에서 유래한 과립성 백혈구의 콜로니 자극인자(hG-CSF)의 유전자 및 Trc 프로모터를 포함하며, 도 14에 도시된 바와 같은 플라스미드 벡터 pTHKCSFmII.

【청구항 4】

제 3항의 플라스미드 벡터 pTHKCSFmII로 형질전환된 대장균(*E. coli*).

【청구항 5】

제 4항에 있어서,

대장균 XL1-Blue(*E. coli* XL1-Blue), 대장균 MC4100, 대장균 BL21(DE3), 대장균 HB101 및 대장균 W3110로 구성된 그룹으로부터 선택되는 1종인 것을 특징으로 하는 형질전환된 대장균.

【청구항 6】

제 1항의 플라스미드 벡터 pTHKCSFmII로 형질전환된 대장균 MC4100/pTHKCSFmII(KCTC 0754BP).

【청구항 7】

제 1항의 플라스미드 벡터로 형질전환된 미생물을 배양하여 그 배양액으로부터 인체에서 유래한 과립성 백혈구의 콜로니 자극인자(hG-CSF) 융합단백질을 수득하고, 이에 단백질 분해효소를 처리하여 인체 과립성 백혈구의 콜로니 자극인자를

수득하는 단계를 포함하는 인체 과립성 백혈구의 콜로니 자극인자의 제조방법.

【청구항 8】

제 7항에 있어서,

니켈칼럼(Ni-column)을 사용하여 인체에서 유래한 과립성 백혈구의 콜로니 자극인자(hG-CSF) 융합단백질을 수득하는 것을 특징으로 하는 인체 과립성 백혈구의 콜로니 자극인자의 제조방법.

【청구항 9】

제 7항에 있어서,

단백질 분해효소는 팩터 Xa(Factor Xa)인 것을 특징으로 하는 인체 과립성 백혈구의 콜로니 자극인자의 제조방법.

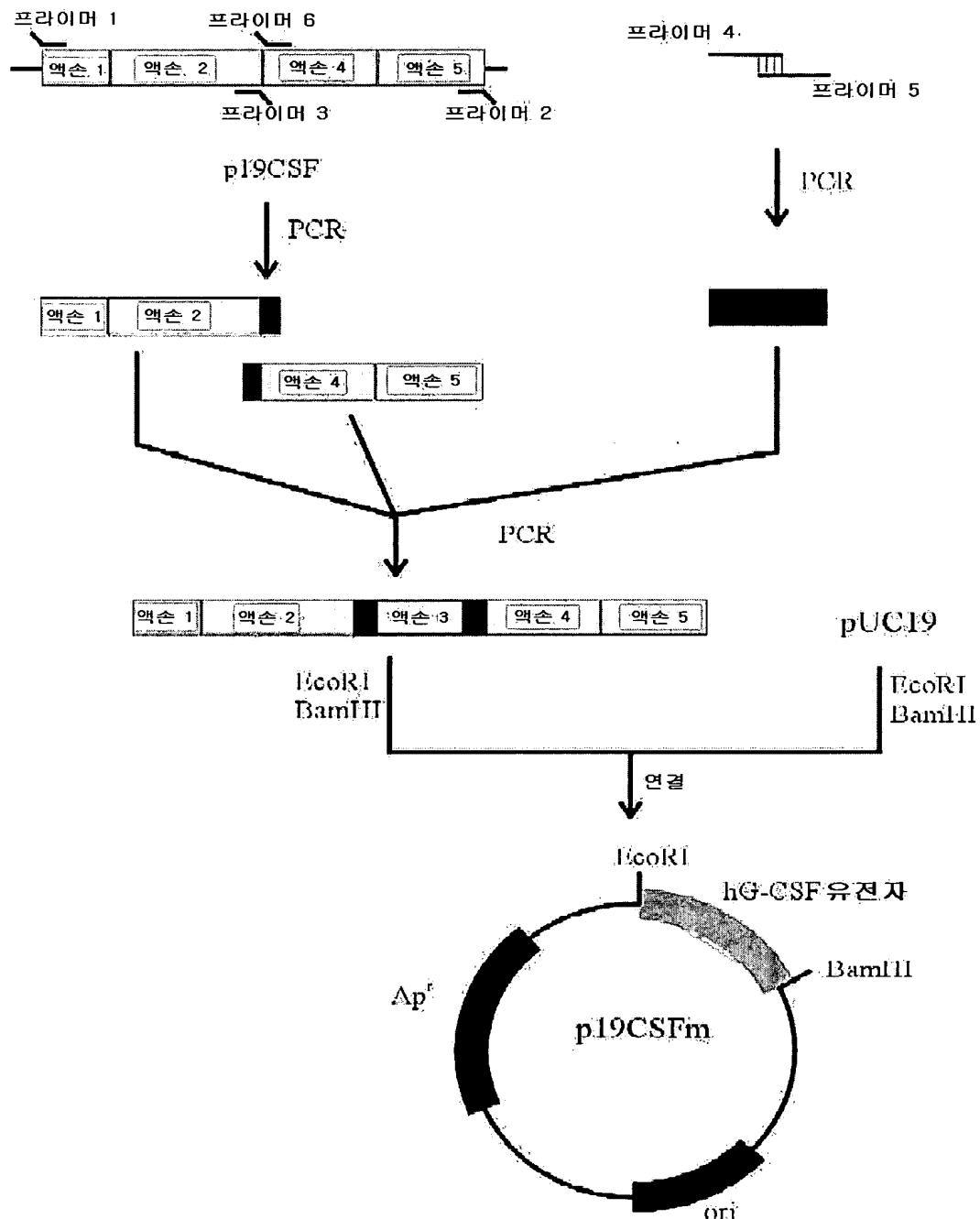
【도면】

【도 1】

1	ATG	GCT	GGA	CCT	GCC	ACC	CAG	AGC	CCC	ATG	AAG	CTG	ATG	GCC	CTG	45
46	CAG	CTG	CTG	CTG	TGG	AGT	GCA	CTC	TGG	ACA	GTG	CAG	GAA	GCC	ACC	90
91	CCC	CTG	GGC	CCT	GCC	AGC	TCC	CTG	CCC	CAG	AGC	TTC	CTG	CTC	AAG	135
136	TGC	TTA	GAG	CAA	GTG	AGG	AAG	ATC	CAG	GGC	GAT	GGC	GCA	GCG	CTC	180
181	CAG	GAG	AAG	CTG	GCA	GGC	TGG	TTG	AGC	CAA	CTC	CAT	AGC	GGC	CTT	225
226	TTC	CTC	TAC	CAG	GGG	CTC	CTG	CAG	GCC	CTG	GAA	GGG	ATC	TCC	CCC	270
271	GAG	TTG	GGT	CCC	ACC	TTG	GAC	ACA	CTG	CAG	CTG	GAC	GTC	GCC	GAC	315
316	TTT	GCC	ACC	ACC	ATC	TGG	CAG	CAG	ATG	GAA	GAA	CTG	GGA	ATG	GCC	360
361	CCT	GCC	CTG	CAG	CCC	ACC	CAG	GGT	GCC	ATG	CCG	GCC	TTC	GCC	TCT	405
406	GCT	TTC	CAG	CGC	GGG	GCA	GGA	GGG	GTC	CTA	GTT	GCC	TCC	CAT	CTG	450
451	CAG	AGC	TTC	CTG	GAG	GTG	TCG	TAC	GGC	GTT	CTA	GGC	CAC	CTT	GCC	495
496	CAG	CCC	TAA	TAA												508

종결코돈 (참조: 서열번호 17)

【도 2】



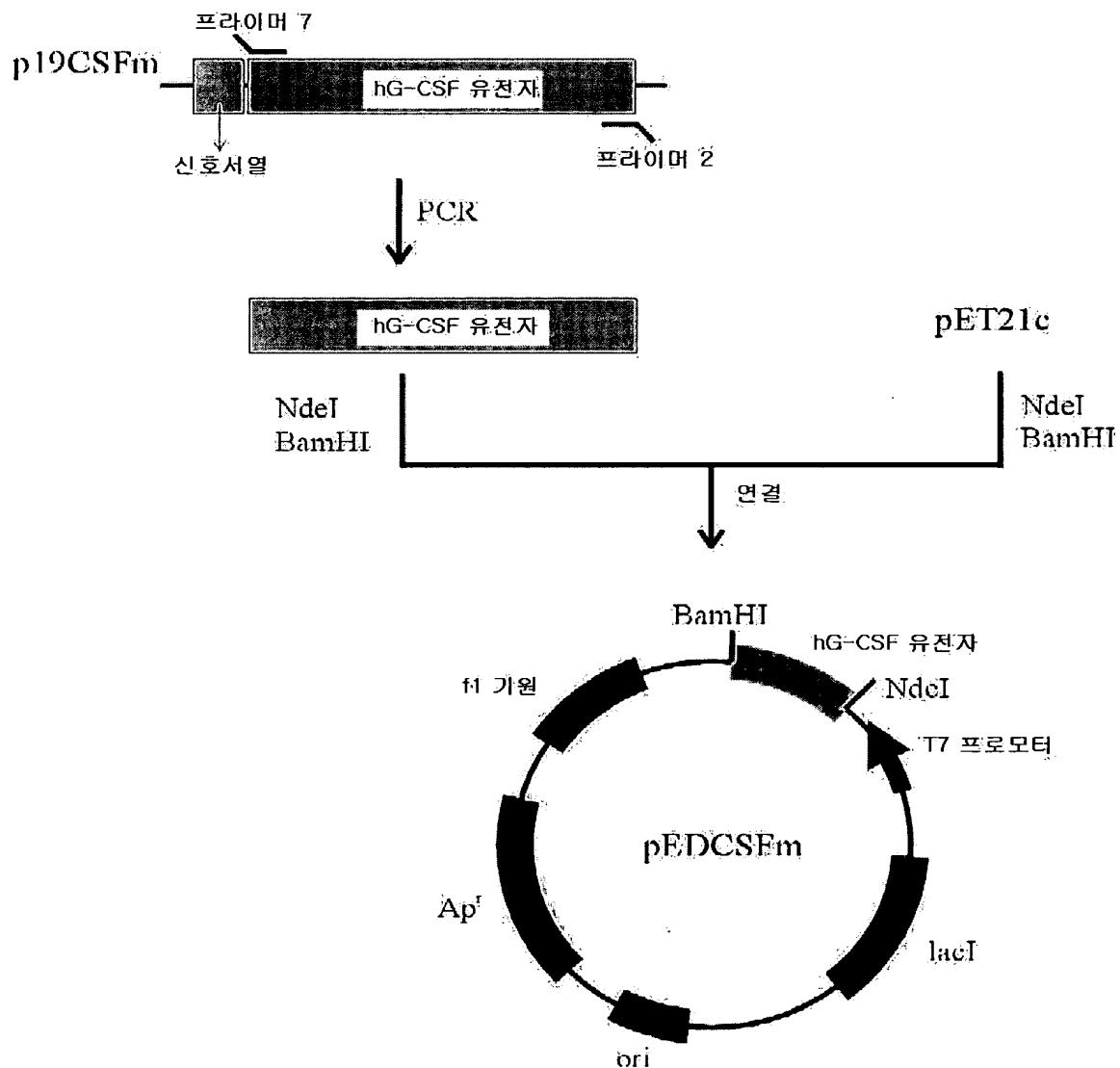
【도 3】

1 ATG GCT GGA CCT GCC ACC CAG AGC CCC ATG AAG CTG ATG GCC CTG 45
 16
 15 46 CAG CTG CTG CTG TGG AGT GCA CTC TGG ACA GTG CAG GAA GCC ACC +1 90
 Thr.
 2 91 CCC CTG GGC CCT GCC AGC TCC CTG CCC CAG AGC TTC CTG CTC AAG 135
 Pro Leu Gly Pro Ala Ser Ser Leu Pro Gln Ser Phe Leu Leu Lys
 17 136 TGC TTA GAG CAA GTG AGG AAG ATC CAG GGC GAT GGC GCA GCG CTC 180
 Cys Leu Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Gly Asp Gly Ala Ala Leu
 32 181 CAG GAG AAG CTG TGT GCC ACC TAC AAG CTG TGC CAC CCC GAG GAG 225
 Gln Glu Lys Leu Cys Ala Thr Tyr Lys Leu Cys His Pro Glu Glu
 47 226 CTG GTG CTG CTC GGA CAC TCT CTG GGC ATC CCC TGG GCT CCC CTG 270
 Leu Val Leu Leu GLy His Ser Leu Gly Ile Pro Trp Ala Pro Leu
 62 271 AGC AGC TGC CCC AGC CAG GCC CTG CAG CTG GCA GGC TGC TTG AGC 315
 Ser Ser Cys Pro Ser Gln Ala Leu Gln Leu Ala Gly Cys Leu Ser
 77 316 CAA CTC CAT AGC GGC CTT TTC CTC TAC CAG GGG CTC CTG CAG GCC 360
 Gln Leu His Ser Gly Leu Phe Leu Tyr Gln Gly Leu Leu Gln Ala
 92 361 CTG GAA GGG ATC TCC CCC GAG TTG GGT CCC ACC TTG GAC ACA CTG 405
 Leu Glu Gly Ile Ser Pro Glu Leu Gly Pro Thr Leu Asp Thr Leu
 107 406 CAG CTG GAC GTC GCC GAC TTT GCC ACC ACC ATC TGG CAG CAG ATG 450
 Gln Leu Asp Val Ala Asp Phe Ala Thr Thr Ile Trp Gln Gln Met
 121
 122 451 GAA GAA CTG GGA ATG GCC CCT GCC CTG CAG CCC ACC CAG GGT GCC 495
 Glu Glu Leu Gly Met Ala Pro Ala Leu Gln Pro Thr Gln Gly Ala
 137 496 ATG CCG GCC TTC GCC TCT GCT TTC CAG CGC CGG GCA GGA GGG GTC 540
 Met Pro Ala Phe Ala Ser Ala Phe Gln Arg Arg Ala Gly Gly Val
 152 541 CTA GTT GCC TCC CAT CTG CAG AGC TTC CTG GAG GTG TCG TAC CGC 585
 Leu Val Ala Ser His Leu Gln Ser Phe Leu Glu Val Ser Tyr Arg
 167 586 GTT CTA CGC CAC CTT GCC CAG CCC TAA TAA 616
 Val Leu Arg His Leu Ala Gln Pro 종결코드

(참조: 서열번호 18)

(참조: 서열번호 19)

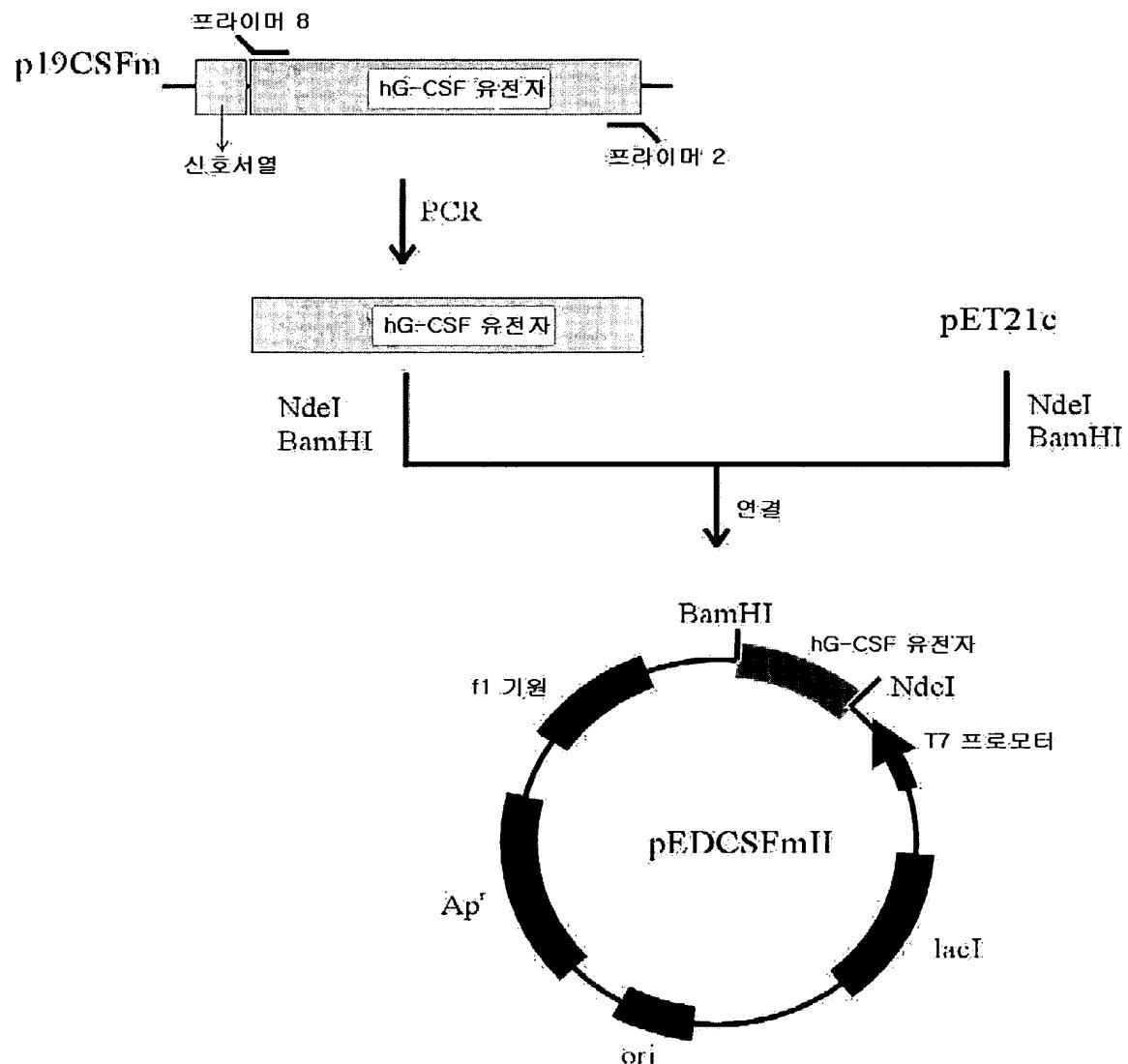
【도 4】



【도 5】

1 ATG ACC CCC CTG GGC CCT GCC AGC TCC CTG CCC CAG AGC TTC CTG 15
 Met Thr Pro Leu Gly Pro Ala Ser Ser Leu Pro Gln Ser Phe Leu
 16 46 CTC AAG TGC TTA GAG CAA GTG AGG AAG ATC CAG GGC GAT GGC GCA 30
 Leu Lys Cys Leu Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Gly Asp Gly Ala
 31 91 GCG CTC CAG GAG AAG CTG TGT GCC ACC TAC AAG CTG TGC CAC CCC 45
 Ala Leu Gln Glu Lys Leu Cys Ala Thr Tyr Lys Leu Cys His Pro
 46 136 GAG GAG CTG GTG CTG CTC GGA CAC TCT CTG GGC ATC CCC TGG GCT 60
 Glu Glu Leu Val Leu Leu Gly His Ser Leu Gly Ile Pro Trp Ala
 61 181 CCC CTG AGC AGC TGC CCC AGC CAG GCC CTG CAG CTG GCA GGC TGC 75
 Pro Leu Ser Ser Cys Pro Ser Gln Ala Leu Gln Leu Ala Gly Cys
 76 226 TTG AGC CAA CTC CAT AGC GGC CTT TTC CTC TAC CAG GGG CTC CTG 90
 Leu Ser Gln Leu His Ser Gly Leu Phe Leu Tyr Gln Gly Leu Leu
 91 271 CAG GCC CTG GAA GGG ATC TCC CCC GAG TTG GGT CCC ACC TTG GAC 105
 Gln Ala Leu Glu Gly Ile Ser Pro Glu Leu Gly Pro Thr Leu Asp
 106 316 ACA CTG CAG CTG GAC GTC GCC GAC TTT GCC ACC ACC ATC TGG CAG 120
 Thr Leu Gln Leu Asp Val Ala Asp Phe Ala Thr Thr Ile Trp Gln
 121 361 CAG ATG GAA GAA CTG GGA ATG GCC CCT GCC CTG CAG CCC ACC CAG 135
 Gln Met Glu Glu Leu Gly Met Ala Pro Ala Leu Gln Pro Thr Gln
 136 406 GGT GCC ATG CCG GCC TTC GCC TCT GCT TTC CAG CGC CGG GCA GGA 150
 Gly Ala Met Pro Ala Phe Ala Ser Ala Phe Gln Arg Arg Ala Gly
 151 451 GGG GTC CTA GTT GCC TCC CAT CTG CAG AGC TTC CTG GAG GTG TCG 165
 Gly Val Leu Val Ala Ser His Leu Gln Ser Phe Leu Glu Val Ser
 166 496 TAC CGC GTT CTA CGC CAC CTT GCC CAG CCC TAA TAA 175
 Tyr Arg Val Leu Arg His Leu Ala Gln Pro 종결고돈 531
 (참조: 서열번호 20)
 (참조: 서열번호 21)

【도 6】



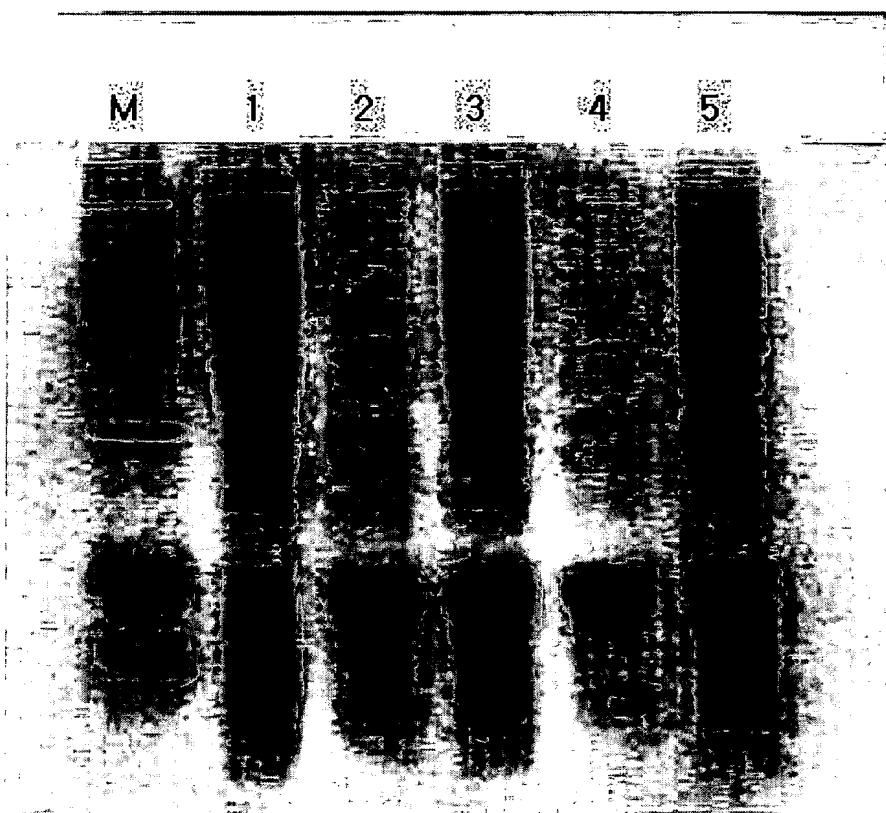
【도 7】

1 ATG ACT CCC TTA GGT CCA GCC AGC TCC CTG CCC CAG AGC TTC CTG 15
Met Thr Pro Leu Gly Pro Ala Ser Ser Leu Pro Gln Ser Phe Leu 45

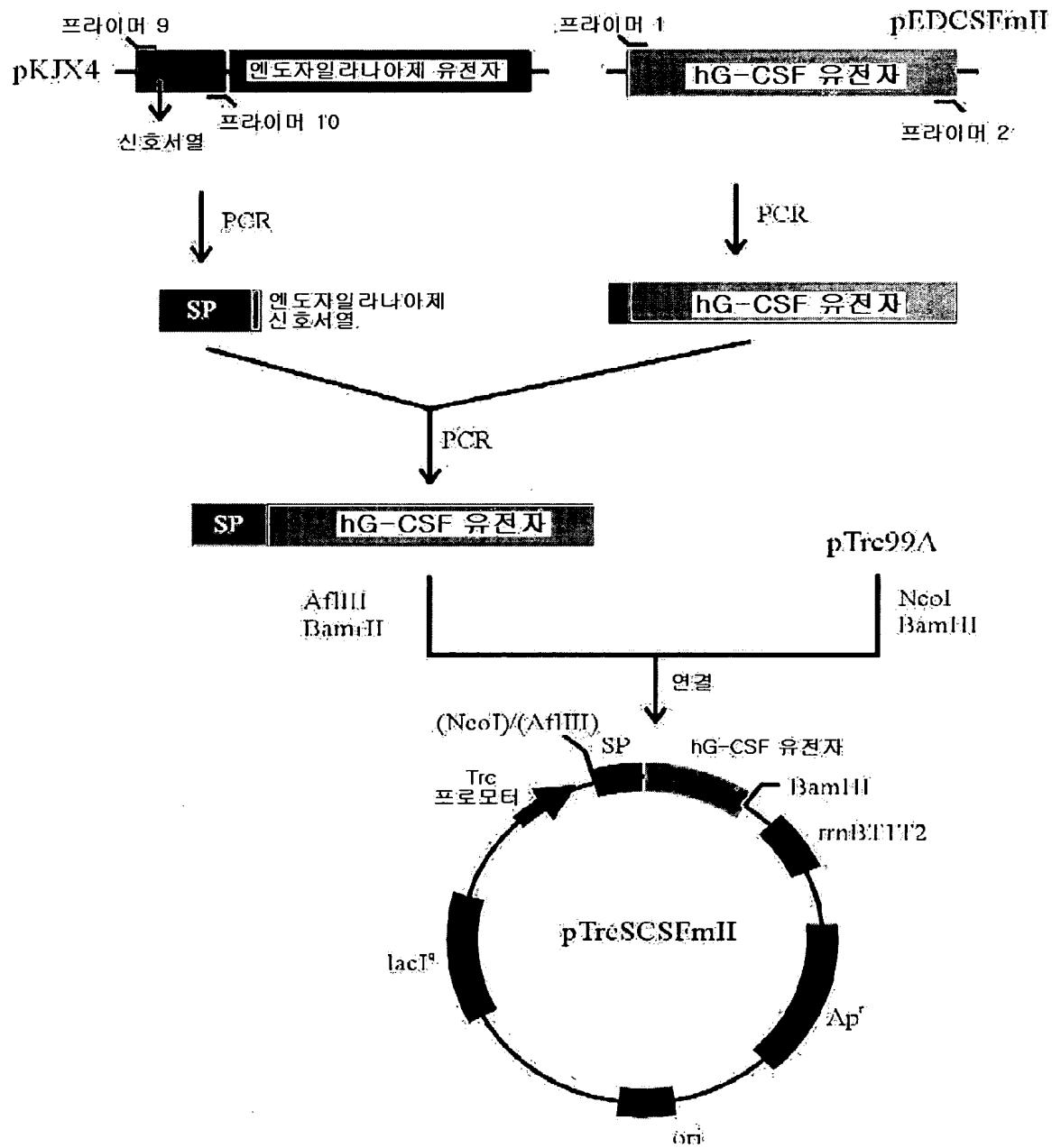
(참조: 서열번호 22)

(참조: 서열번호 23)

【도 8】



【도 9】



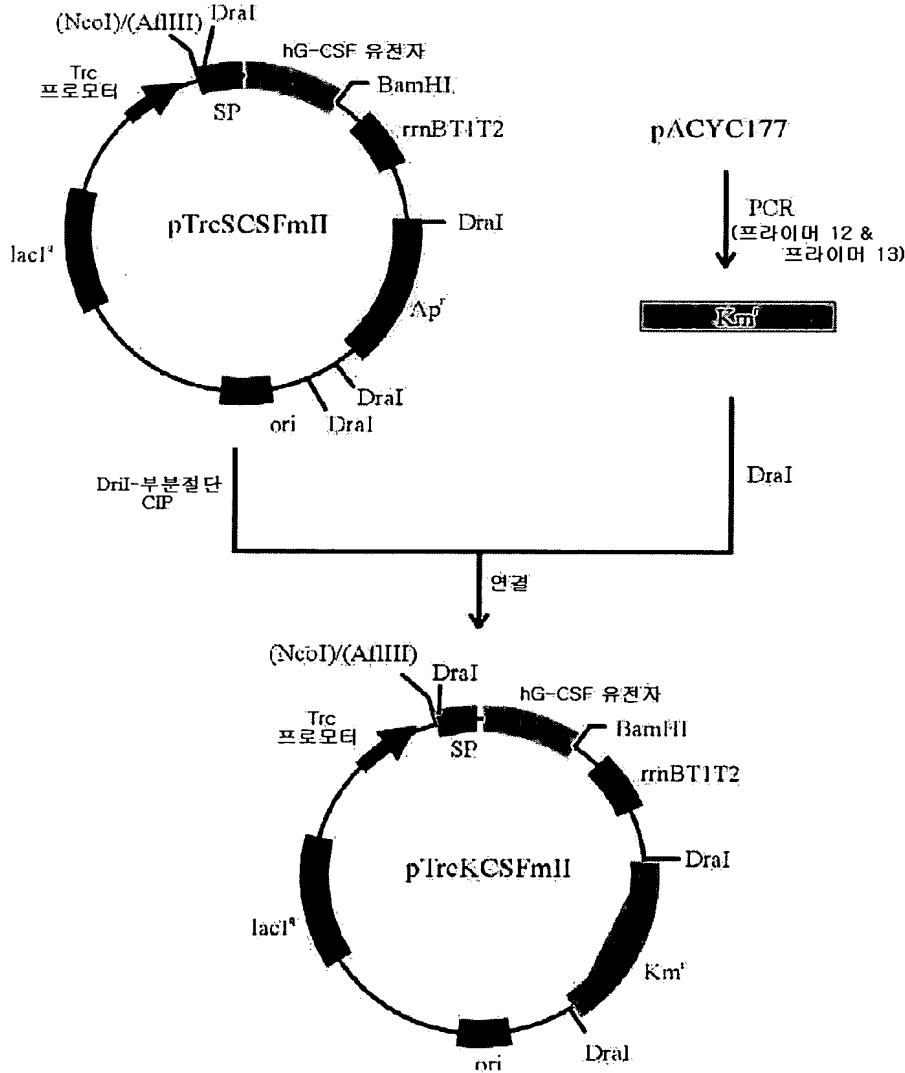
【도 10】

-28.	-14
1 ATG TTT AAG TTT AAA AAG AAA TTC TTA GTG GGA TTA ACG GCA GCT Met Phe Lys Phe Lys Lys Phe Leu Val Gly Leu Thr Ala Ala	45.
-13.	-1 +1 2
46 TTC ATG AGT ATG AGC ATG TTT TCT GCA ACC GCC TCT GC4 ACT CCG Phe Met Ser Ile Ser Met Phe Ser Ala Thr Ala Ser Ala Thr Pro	90.
3	17
91 TTA GGT CCA GCC AGC TCC CTG CCC CAG AGC TTC CTG CTC AAG TGC Leu Gly Pro Ala Ser Ser Leu Pro Gln Ser Phe Leu Leu Lys Cys	135.
(참조 : 서열번호 24)	
(참조 : 서열번호 25)	

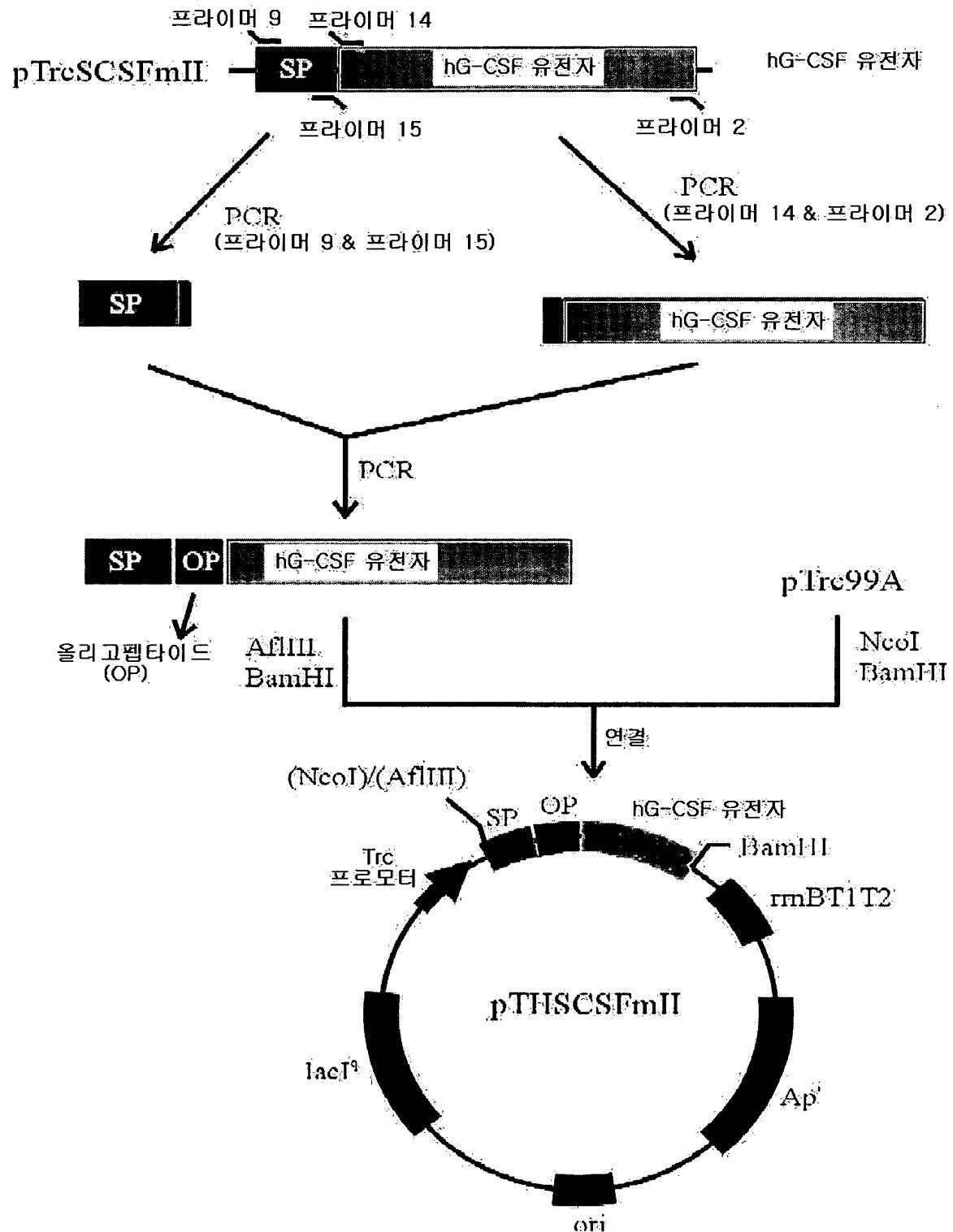
(참조: 서열번호 24)
(참조: 서열번호 25)

(总页数：10页，已用：8页)

[도 11]



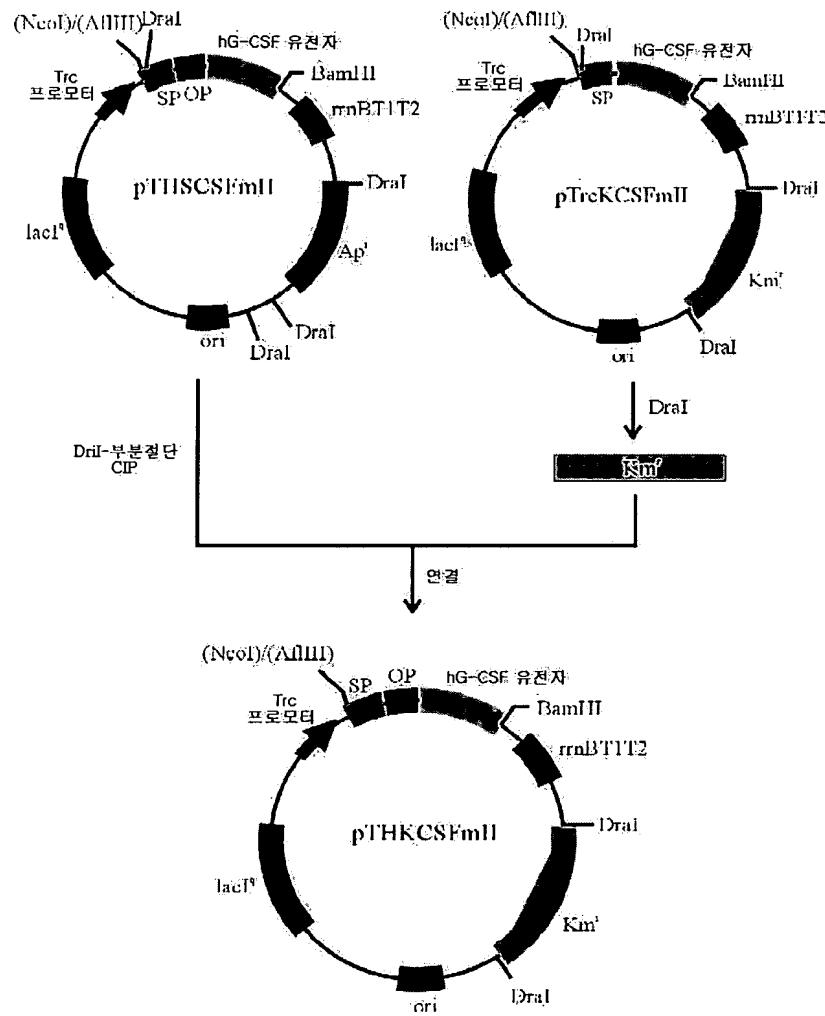
【도 12】



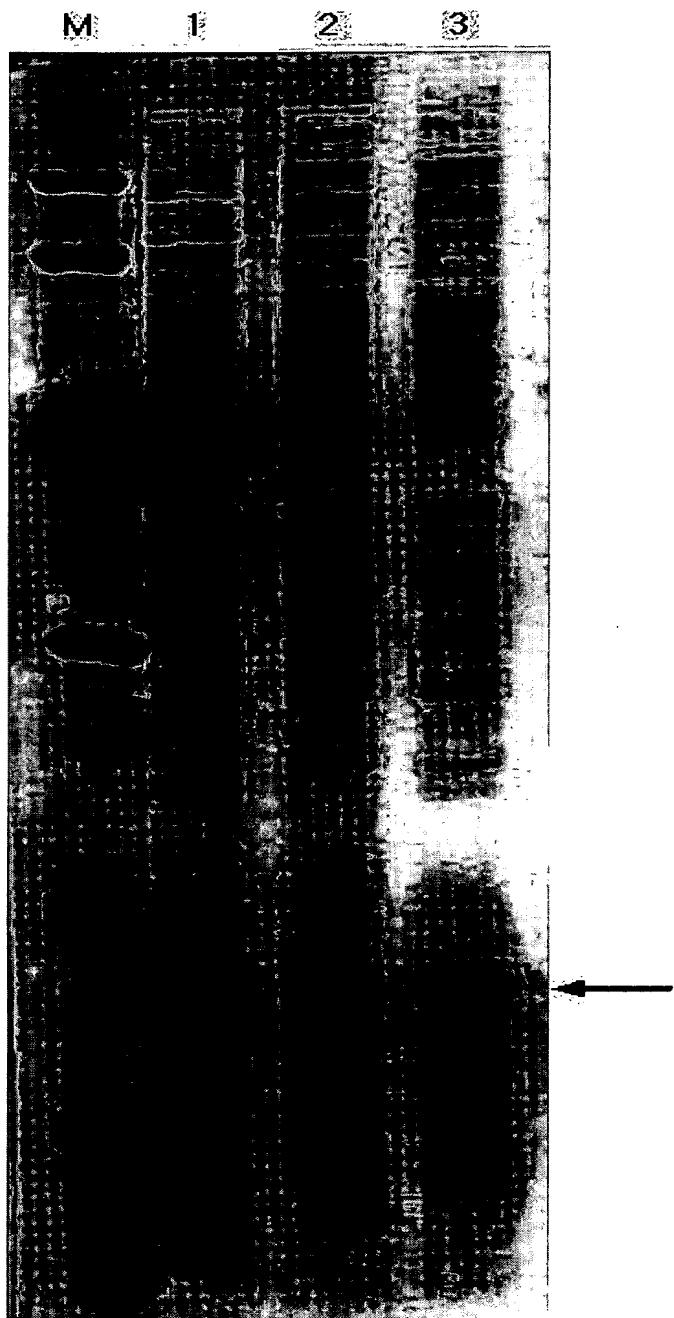
【도 13】

-28		-14	
1	ATG TTT AAG TTT AAA AAG AAA TTC TTA GTG GGA TTA AGC GCA GCT	45	
	Net Phe Lys Phe Lys Lys Lys Phe Leu Val Gly Leu Thr Ala Ala		
-13		-1	+1 2
46	TTC ATG AGT ATC AGC ATG TTT TCT GCA AGC GGC TCT GCA GCT GGC	90	
	Phe Met Ser Ile Ser Net Phe Ser Ala Thr Ala Ser Ala Ala Gly		
3		17	
91	CCG CAC CAT CAC CAT CAC CAT ATC GAG GGA AGG ACT CCG TTA GGT	135	
	Pro His His His His His Ile Glu Gly Arg Thr Pro Leu Gly		
18		32	
136	CCA GCC AGC TCC CTG CCC CAG AGC TTC CTG CTC AAG TGC TTA GAG	180	
	Pro Ala Ser Ser Leu Pro Gln Ser Phe Leu Leu Lys Cys Leu Glu		

【도 14】



【도 15】



【서열목록】

<110> Korea Advanced Institute of Science and Technology
 <120> Escherichia coli Strain Secreting Human Granulocyte Colony Stimulating Factor(G-CSF)
 <130> DP00301
 <140> 12-3456-7890123
 <141> 2000-03-18
 <160> 16
 <170> KOPATIN 1.5
 <210> 1
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> oligopeptide
 <400> 1

Ala Gly Pro His His His His His Ile Glu Gly Arg

1	5	10
---	---	----

<210> 2
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> primer
 <400> 2

gcgaaattcat ggctggacct gccacccag	29
<210> 3	
<211> 32	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	



<220>
<223> primer
<400> 3
gcgatccctt attaggcgtg ggcaagggtgg cg 32
<210> 4
<211> 50
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> primer
<400> 4
tcctcggtt ggcacagctt gtaggtggca cacagttct cctggagcgc 50
<210> 5
<211> 50
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> primer
<400> 5
gctgtgccac cccgaggagc tggtgctgct cggacactct ctggcatcc 50
<210> 6
<211> 50
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> primer
<400> 6
ctggctgggg cagctgctca ggggagccca ggggatgccc agagagtgc 50
<210> 7
<211> 48
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> primer
<400> 7
agcagctgcc ccagccaggc cctgcagctg gcaggctgct tgagccaa 48
<210> 8

<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> primer
<400> 8
gaattcatat gaccccccgtg ggccctgcga gc 32
<210> 9
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> primer
<400> 9
gaattcatat gactccgtta ggtccagcga gc 32
<210> 10
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> primer
<400> 10
ggaaattcaca tggtaagtt taaaaagaaa ttc 33
<210> 11
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> primer
<400> 11
ggctggacct aacggagttt cagaggcg 29
<210> 12
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> primer

<400> 12
gcaaccgcct ctgcaactcc gtttaggtcca gcc 33
<210> 13
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> primer
<400> 13
gcgaattctt taaagccacg ttgtgtcctc aaa 33
<210> 14
<211> 36
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> primer
<400> 14
gcgaattctt taaattagaa aaactcatcg agcatac 36
<210> 15
<211> 39
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> primer
<400> 15
caccatcacc atatcgaagg ccgtactccg tttaggtcca 39
<210> 16
<211> 41
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> primer
<400> 16
gatatggta tggtgatggc gcgggccagc tgcagaggcg g 41